

白藜芦醇通过 TLR4/MyD88 依赖性信号通路对 SW1353 细胞发挥抗骨关节炎作用的实验研究

刘旭丹, 于晓璐, 赵越, 徐小磊, 姜梦琪, 何建宜, 刘莉

中国医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110122

摘要: **目的** 探讨白藜芦醇(resveratrol, RES)通过抑制 TLR4/MyD88 依赖性信号通路发挥抗白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)诱导的 SW1353 细胞骨关节炎(osteoarthritis, OA)作用。**方法** 3-(4,5-二甲基吡唑-2-基)-5-(3-羧基甲氧基苯基)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑盐法[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt, MTS]测定 RES(0~100 μ mol/L)及 IL-1 β (10 ng/ml)对 SW1353 细胞增殖活力的影响。采用 RES(12.5, 50 μ mol/L)处理经 IL-1 β (10 ng/ml)诱导的细胞,ELISA 法检测培养基上清中白细胞介素 6(IL-6)水平,Western blot 法检测软骨细胞 Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)、髓样分化蛋白 88(myeloid differentiation factor 88, MyD88)蛋白表达。**结果** IL-1 β (10 ng/ml)对细胞增殖活力无明显影响,RES(3.125~25 μ mol/L)可显著增强细胞活力($P<0.05$),RES(100 μ mol/L)可显著抑制细胞活力($P<0.05$)。IL-1 β 可显著增加培养基上清 IL-6 水平($P<0.05$),且具有时间依赖性;同时 IL-1 β 也可显著增加软骨细胞 TLR4 及 MyD88 的蛋白表达($P<0.05$)。RES 处理可显著降低培养基上清 IL-6 水平($P<0.05$)及软骨细胞的 TLR4 及 MyD88 的蛋白表达($P<0.05$)。**结论** RES 可能通过抑制 TLR4/MyD88 依赖性信号通路发挥抗 IL-1 β 诱导的 SW1353 细胞的 OA 效应,在 OA 的防治方面有潜在的应用前景。

关键词: 骨性关节炎; 白藜芦醇; Toll 样受体 4; 髓样分化蛋白 88; SW1353 细胞

中图分类号: R151.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2017)11-1296-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2017.11.005

Anti-osteoarthritis effect of resveratrol on SW1353 cell line via TLR4/MyD88 signaling pathway: an *in vitro* study

LIU Xu-dan, YU Xiao-lu, ZHAO Yue, XU Xiao-lei, JIANG Meng-qi, HE Jian-yi, LIU Li

Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning 110122, China

Corresponding author: Liu Li, E-mail: lliu@cmu.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate whether resveratrol (RES) could exert anti-osteoarthritis (anti-OA) effect on SW1353 cell line induced by interleukin-1 β (IL-1 β) via TLR4/MyD88 dependent signaling pathway. **Methods** The effects of RES(0~100 μ mol/L) and IL-1 β (10 ng/ml) on the proliferation viability of SW1353 cells were determined by MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt). The SW1353 cells induced by IL-1 β (10 ng/ml) were treated by RES (12.5 μ mol/L, 50 μ mol/L), the level of interleukin-6 (IL-6) in the supernatant of the culture media was measured by ELISA and the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4) and myeloid differentiation factor 88 (MyD88) protein was examined by Western blot. **Results** MTS showed that IL-1 β (10 ng/ml) had no significant effect on the cell proliferation viability, while RES at 3.125~25 μ mol/L could significantly enhance the cell proliferation viability ($P<0.05$) and RES at 100 μ mol/L could significantly inhibit the cell proliferation viability ($P<0.05$). IL-1 β could up-regulate IL-6 level in the supernatant of culture media in a time-dependent manner ($P<0.05$), and increase the expression of TLR4 and MyD88 protein in SW1353 cells ($P<0.05$). RES treatment could dramatically down-regulate IL-6 level in the supernatant of culture media ($P<0.05$) as well as the expression of TLR4 and MyD88 protein in SW1353 cells ($P<0.05$). **Conclusions** Resveratrol may prevent IL-1 β -induced osteoarthritis in SW1353 cell line by inhibiting the TLR4/MyD88 dependent signaling pathway. It has potential value in osteoarthritis prevention and treatment.

Key words: osteoarthritis; resveratrol; toll-like receptor 4; myeloid differentiation factor 88; SW1353 cell line

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81372971)

作者简介: 刘旭丹(1992-),女,硕士在读,研究方向:营养与慢性病。

通信作者: 刘莉, E-mail: lliu@cmu.edu.cn。

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 又称骨关节病, 是一种在全球范围内广泛存在并危害人类健康的疾病^[1], 以关节软骨退变及继发性骨质增生为主要特征^[2]。OA 的危险因素可分为系统性因素 (如年龄、性别、肥胖等) 与自身生物力学因素 (如运动、关节损伤等) 等^[3], 目前尚未明确 OA 的确切发病机理, 但宿主炎症反应在其中起重要作用, 并被认为是 OA 症状出现的主要驱动力^[4]。Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 是一种模式识别受体^[5], 与炎症的发生密切相关。研究发现, OA 患者软骨中 TLR4 的表达显著升高, 并且 IV 级 OA 患者明显高于 I 级患者^[4]。白藜芦醇 (resveratrol, RES) 是一种带有对称二苯代乙烯结构的多酚类植物化学物^[6], 目前已被证实具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化、免疫调节等作用^[7]。本实验室的前期结果表明, RES 可以通过抑制离体 OA 软骨细胞中 TLR4、NF- κ B 的 mRNA 表达, 发挥抗 OA 作用^[8]。但对于蛋白表达情况并未检测, 也未探讨该效应是由 TLR4 的哪条信号通路所发挥。因此, 本研究旨在从蛋白水平探讨 RES 是否可以通过抑制 TLR4/MyD88 依赖性信号通路发挥抗 OA 作用, 为进一步探究 OA 的发病机制及 OA 患者的营养防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 SW1353 细胞培养 SW1353 细胞购置于中国科学院上海生科院细胞资源中心, 使用 DMEM 完全培养基 (含 10% FBS 和 1% 双抗), 于 37 °C、5% CO₂、高湿度培养箱中培养。

1.2 主要仪器和试剂

1.2.1 主要仪器 Multiskan MK3 酶标仪 (美国 Thermo); EPS-300 电泳仪 (中国上海天能科技有限公司); VE-180 垂直电泳槽 (中国上海天能科技有限公司); 电泳凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2.2 主要试剂 RES (美国 Sigma); IL-1 β (美国 PeproTech); ELISA 试剂盒 (中国博士德); BCA 蛋白定量试剂盒、RIPA 裂解液 (中国碧云天); β -actin、TLR4、MyD88 抗体 (美国 Santa Cruz Biotechnology); 山羊抗兔二抗 (北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); HRP 山羊抗小鼠二抗 IgG (美国 Earthox); 预染蛋白 Marker、化学发光底物 (美国 Thermo)。

1.3 方法

1.3.1 MTS 法检测细胞增殖活力 取对数生长期细胞, 经 0.25% 胰酶消化后制备单细胞悬液接种于 96 孔板, 每孔 100 μ l (约含细胞数 2 000 个), 置于培养箱中培养至贴壁。设置: 空白对照组、溶剂对照组 (2%

DMSO), RES (3.125、6.25、12.5、25、50、100 μ mol/L) 处理组、IL-1 β (10 ng/ml) 处理组、RES (3.125 ~ 100 μ mol/L) + IL-1 β (10 ng/ml) 处理组; 分别处理 24、48 h。按 MTS 试剂盒说明书操作, 酶标仪 490 nm 下测量, 读取 OD 值。

1.3.2 细胞处理 取对数生长期细胞接种于 100 mm 的培养皿中, 待融合为单层后进行处理。设置: 对照组 (2% DMSO)、IL-1 β (10 ng/ml) 处理组、RES (12.5、50 μ mol/L) + IL-1 β (10 ng/ml) 处理组; 分别处理 8、24、48 h。收集细胞及培养基上清, 待测。

1.3.2.1 ELISA 检测 细胞培养上清中细胞因子 IL-6 的表达水平根据 ELISA 说明书操作。

1.3.2.2 Western Blot 检测 TLR4、MyD88 蛋白表达 RIPA 裂解细胞, BCA 蛋白定量试剂盒定量, 统一浓度至 1 μ g/ μ l。每孔上样 20 μ g, 电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1.5 h, PBS-T 洗膜, 一抗 (1:500) 4 °C 过夜, 漂洗, 二抗 (1:5 000) 室温 2 h, 漂洗后于 ECL 成像系统中发光显影。 β -actin 做内参, 所得结果进行图像灰度扫描进行半定量分析。

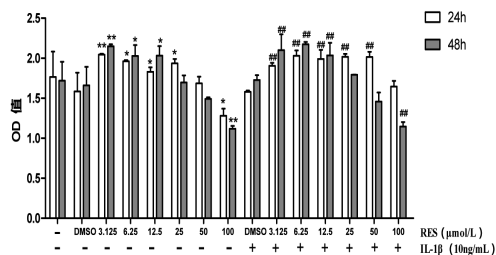
1.4 数据分析 利用 SPSS 20.0 软件进行统计分析, 数据均满足方差齐性, 实验结果用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行统计描述。总体比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 LSD, 通过重复测量方差分析探讨 IL-1 β 处理下 SW1353 细胞上清液中 IL-6 的表达是否存在时间依赖性, 检验水准 $\alpha = 0.05$ (双侧)。

2 结果

2.1 不同浓度 RES 和/或 IL-1 β 处理对 SW1353 细胞增殖活力的影响 见图 1。与空白对照组相比, DMSO 对细胞增殖活力无明显影响 ($P > 0.05$); 与 DMSO 组相比, RES (3.125 ~ 25 μ mol/L) 处理 24 h、RES (3.125 ~ 12.5 μ mol/L) 处理 48 h 后, 细胞增殖活力显著增强 ($P < 0.05$), 且 RES (3.125 μ mol/L) 作用最为显著 ($P < 0.01$); 而 RES (100 μ mol/L) 可显著抑制细胞活力 ($P < 0.05$), 且 48 h 作用更加显著 ($P < 0.01$); 单纯 IL-1 β 处理对细胞增殖活力无明显影响 ($P > 0.05$); 但与单纯 IL-1 β 组相比, IL-1 β + RES (3.125 ~ 50 μ mol/L) 处理 24 h、IL-1 β + RES (3.125 ~ 12.5 μ mol/L) 处理 48 h 后, 细胞增殖活力明显增强 ($P < 0.01$)。

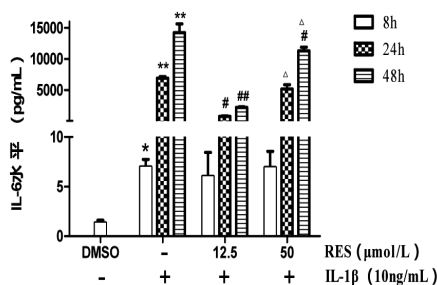
2.2 不同浓度 RES 对 IL-1 β 处理的 SW1353 细胞分泌 IL-6 水平的影响 见图 2。与 DMSO 组相比, IL-1 β 处理 8 h 后 IL-6 水平即显著升高 ($P < 0.05$), 24、48 h 后 IL-6 水平则进一步升高 ($P < 0.01$), 具有时间依赖性, 经重复测量方差分析结果表明: 影响 IL-6 水

平的干预主效应与时间主效应有统计学意义 ($P < 0.05$), 即不同处理时间 IL-6 水平差异有统计学意义, 影响 IL-6 水平的干预主效应与时间主效应之间存在交互作用 ($P < 0.05$); 与 IL-1 β 组相比, RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 及 RES (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 后可使 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$), RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 后也可使 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.01$); 与 RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 组相比, RES (50 $\mu\text{mol/L}$) 使 IL-6 水平降低的作用较弱, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: 与 DMSO 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 IL-1 β 处理组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图 1 RES 与 IL-1 β 对 SW1353 细胞增殖活力的影响



注: 与 DMSO 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 IL-1 β 处理组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 相比, $\Delta P < 0.05$ 。

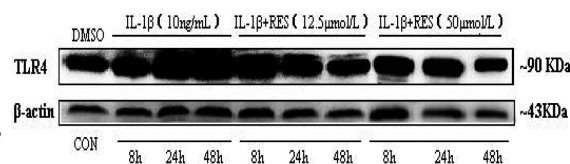
图 2 不同浓度 RES 对 IL-1 β 处理的

SW1353 细胞分泌 IL-6 水平影响

2.3 不同浓度 RES 对 IL-1 β 处理的 SW1353 细胞 TLR4、MyD88 蛋白表达影响 见图 3。与 DMSO 组相比, 经 IL-1 β 处理后, TLR4 的表达量显著增多 ($P < 0.01$), 且呈时间依赖性; 与 IL-1 β 组相比, RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理 24 h 后, TLR4 的表达量显著降低 ($P < 0.05$), RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h、RES (50 $\mu\text{mol/L}$) 处理 8、24、48 h 后 TLR4 的表达量也显著下降 ($P < 0.01$); 与 RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 组相比, RES (50 $\mu\text{mol/L}$) 作用下, TLR4 的表达量下降更为明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

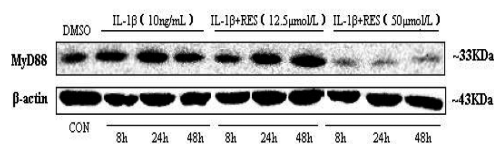
与 DMSO 组相比, 加 IL-1 β 处理后, MyD88 的表达量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且于处理 24 h 后升高最为明显; 与 IL-1 β 组相比, 加 RES (12.5、

50 $\mu\text{mol/L}$) 后, MyD88 的表达量均有所降低, 且除 RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 处理 48 h 外, 其余各组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 相比, RES (50 $\mu\text{mol/L}$) 作用下, MyD88 的表达量降低更为明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 4。



注: 与 DMSO 组相比, * $P < 0.01$; 与 IL-1 β 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 相比, $\Delta P < 0.01$ 。

图 3 不同浓度 RES 对 IL-1 β 处理的 SW1353 细胞 TLR4 蛋白表达影响



注: 与 DMSO 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 IL-1 β 组相比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 与 RES (12.5 $\mu\text{mol/L}$) 相比, $\Delta P < 0.05$ 。

图 4 不同浓度 RES 对 IL-1 β 处理的 SW1353 细胞 MyD88 蛋白表达影响

3 讨论

白藜芦醇 (3, 4, 5-三羟基二苯乙烯) 是一类活性多酚物质, 具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等作用。RES 难溶于水, 但易溶于甲醇、乙醚、氯仿等有机溶剂, 本次实验中选用 DMSO 做为 RES 的溶剂。DMSO 虽应用广泛但其自身也会对细胞产生毒性作用^[9], 另外 RES 浓度过大也会对细胞有毒性作用^[10]。因此, 本研究采用 MTS 法检测 DMSO 及不同浓度 RES 对细胞增殖活力的影响。实验结果表明: DMSO 浓度 (2%) 对细胞增殖

活力无明显影响;RES 在 100 $\mu\text{mol/L}$ 时显著抑制细胞增殖活性,因此本研究选择了对细胞增殖有促进作用的 RES 浓度(12.5 $\mu\text{mol/L}$)及对细胞增殖无明显作用的最大 RES 浓度(50 $\mu\text{mol/L}$)做为后续实验的处理浓度。

IL-1 β 对 SW1353 细胞的增殖活力无明显影响,与文献报道相一致^[11]。IL-1 β 做为 OA 体外模型的常用诱导剂已被广泛使用^[11],有研究表明,OA 患者软骨细胞中 IL-1 β 被激活,同时其他炎症因子(如 IL-6 水平)也显著增加^[12]。本研究显示,经 IL-1 β 处理后,细胞培养上清中 IL-6 的表达水平显著升高,提示在 IL-1 β (10 ng/ml)作用下,可以诱导 SW1353 细胞发生 OA 反应;加入 RES (12.5、50 $\mu\text{mol/L}$)处理后,IL-6 的表达量均显著下降,提示 RES 可以通过抑制 OA 相关炎症细胞因子的表达,发挥抗 OA 作用。

目前,已有很多研究结果表明 OA 中的软骨降解产物可以通过激活 TLRs,来激活人体的自身免疫反应^[13],使机体维持在一个慢性低度炎症状态。TLR4 是 TLRs 家族在软骨细胞中表达最多的受体形式^[14],也是细菌内毒素产生急性炎症的关键受体,当同时对 TLR4 突变型小鼠及野生型小鼠进行脂多糖染毒时,野生型小鼠血清中 IL-6、TNF- α 的表达量显著增高,TLR4 突变型却无此变化^[15]。说明 TLR4 可以调控细胞因子 IL-6 的表达,从而发挥其炎症作用。在 OA 患者的关节软骨中,TLR4 被激活后,促使炎症因子 IL-1 β 分泌增加,影响蛋白聚糖和 II 型胶原的表达,导致关节软骨的破坏^[16]。本研究显示,经 IL-1 β (10 ng/ml)处理后,TLR4 的蛋白表达量显著升高,表明 OA 时 TLR4 信号通路被激活;但经 RES (12.5、50 $\mu\text{mol/L}$)处理后,TLR4 的表达量均显著下降,提示 RES 可能通过抑制 TLR4 信号通路来发挥缓解炎症的作用。经典的 TLR4 信号通路包括 MyD88 依赖性与 MyD88 非依赖性 (TRIF) 通路。本实验通过检测 MyD88 的蛋白表达,发现经 IL-1 β 处理后,MyD88 的蛋白表达水平显著升高;而 RES (12.5、50 $\mu\text{mol/L}$)处理后,MyD88 的蛋白表达量显著下降,提示 RES 可能是通过抑制 TLR4/MyD88 信号通路发挥的抗 OA 作用。

综上所述,本研究结果提示 RES 可能在体外通过抑制 TLR4/MyD88 依赖性信号通路发挥抗 OA 效应。将来的研究需要进一步探讨其他 TLR4 信号通路的作用及通过动物实验进一步验证。

参考文献

- [1] Peat G, Mc Carney R, Croft P. Knee pain and osteoarthritis in older adults: a review of community burden and current use of primary health care[J]. Ann Rheum Dis, 2001, 60(2): 91-97.
- [2] Goldring MD, Steven R. The role of bone in osteoarthritis pathogenesis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2008, 34(3): 561-571.
- [3] Bruyère O, Cooper C, Arden N, et al. Can we identify patients with high risk of osteoarthritis progression who will respond to treatment? A focus on epidemiology and phenotype of osteoarthritis [J]. Drugs Aging, 2015, 32(3): 179-187.
- [4] Barreto G, Soininen A, Ylinen P, et al. Soluble biglycan: a potential mediator of cartilage degradation in osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2015, 17: 379-393.
- [5] Liu L, Gu H, Liu H, et al. Protective effect of resveratrol against IL-1 β -induced inflammatory response on human osteoarthritis chondrocytes partly via the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15(4): 6925-6940.
- [6] Gambini J, Inglés M, Olaso G, et al. Properties of resveratrol: *in vitro* and *in vivo* studies about metabolism, bioavailability, and biological effects in animal models and humans [J]. Oxid Med Cell Longev, 2015, 2015: 837042.
- [7] 丁宇, 范红. 天然植物活性成份白藜芦醇的抗炎作用研究进展 [J]. 华西医学, 2008, 26(1): 199-200.
- [8] 焦永亮, 刘慧敏, 顾海伦, 等. 白藜芦醇对肥胖者骨性关节炎软骨细胞的作用及对 TLR4、NF- κ B mRNA 表达的影响 [J]. 东南大学学报(医学版), 2015, 34(3): 342-346.
- [9] 罗光成, 易婷婷, 刘素兰, 等. 二甲亚砜对外周血单个核细胞增殖能力和细胞因子分泌功能的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(5): 711-714.
- [10] Schelbergen RF, Blom AB, van den Bosch MH, et al. Alarmins S100A8 and S100A9 elicit catabolic effect in human osteoarthritic chondrocytes that is dependent on Toll-like receptor 4 [J]. Arthritis & Rheumatism, 2012, 64(5): 1477-1487.
- [11] Zeng J, Wang Z, Ma L, et al. Increased receptor activator of nuclear factor κ B ligand/osteoprotegerin ratio exacerbates cartilage destruction in osteoarthritis *in vitro* [J]. Exp Ther Med, 2016, 12(4): 2778-2782.
- [12] Sieghart D, Liszt M, Wanivenhaus A, et al. Hydrogen sulphide decreases IL-1 β -induced activation of fibroblast-like synoviocytes from patients with osteoarthritis [J]. J Cell Mol Med, 2015, 19(1): 187-197.
- [13] Ting JP, Duncan JA, Lei Y, et al. How the noninflammatory NLRs function in the innate immune system [J]. Science, 2010, 327(5963): 286-290.
- [14] Haglund L, Bernier SM, Onnerfjord P, et al. Proteomic analysis of the LPS-induced stress response in rat chondrocytes reveals induction of innate immune response components in articular cartilage [J]. Matrix Biol, 2008, 27(2): 107-118.
- [15] 苏菲. 人参皂苷 Rg1 和 Re 通过 TLR4 通路发挥免疫调节及抗内毒素作用 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
- [16] Kim HA, Cho ML, Choi HY, et al. The catabolic pathway mediated by Toll-like receptors in human osteoarthritic chondrocytes [J]. Arthritis Rheum, 2006, 54: 2152-2163.

收稿日期: 2017-01-04